ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA
VOL. IX, 4 SECTIO D. 1954

Z Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Lublinie.
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Mahrburg.

Stanisław MAHRBURG

Badania nad wpływem wyciągu łożyska, sporządzonego metodą Fiłatowa, na przeszczepialność i rozwój mięsaka Crockera u myszy

Исследования над влиянием экстракта плаценты, приготовленного по методу Филатова на прививочность и развитие саркомы Кронера у мыши

Studies on the influence of placentar extract prepared according to Filatow's method on the transinoculation and growth of Crocker's tumor in the mouse

Ustalenie ścisłego związku pomiędzy hormonami płciowymi (testosteron, follikulina) a ciałami nowotworotwórczymi wprowadzanymi do ustroju (produkty smołowcowe: benzopiren, antracen) pozwoli poznać ciała czynne ustrojowe, które mogą wpływać na wytwarzanie się nowotworów. Wpływ czynników zewnątrzpochodnych na powstawanie samoistnych nowotworów może mieć działanie pośrednie, to znaczy, że wprowadzony czynnik może wyzwolić w ustroju właściwy bodziec nowotworotwórczy, albo może stać się jednym z czynników ułatwiających przemianę nowotworową komórki pod wpływem bodźców ustrojowych. Można również przyjąć, że geneza nowotworów polega na różnorodności działania, i że w wielu przypadkach czynnik ustrojowy może mieć decydujące znaczenie.

Jakkolwiek badania doświadczalne przemawiają za istnieniem czynników nowotworotwórczych wywołujących u zwierzęcia wytwarzanie nowotworu, to jednak nie jest ostatecznie ustalone czy zawsze i czy tylko ten czynnik jest etiologicznie decydującym. W dużej większości jednak nowotworów ludzkich nie możemy

ustalić żadnego ze znanych nam czynników wywołujących nowotwory, w tych przypadkach więc powstawanie nowotworu może być tłumaczone istnieniem bodźców bliżej nie znanych lub też wpływów działających sumarycznie względnie kumulacyjnie.

Terapia hormonalna nowotworów złośliwych była stosowana od czasów bardzo dawnych, ale dopiero teraz wkracza na tory ścisłego poznania. Już w ubiegłym stuleciu obserwowano zanik gruczołu krokowego po trzebieniu. Późniejsze badania stwierdziły ścisłą łączność pomiędzy stanem przedrakowym gruczołu mlekowego, a zwiększonym wytwarzaniem się follikuliny. Badania ostatnich lat natomiast zwróciły uwagę na celowość wykluczenia czynności jajników przy raku gruczołu mlekowego, oraz na dodatni wpływ trzebienia promieniami Rtg w okresie przerzutów. Jednocześnie dalsze obserwacje nad polepszeniem wyniku leczenia nowotworów uznały za konieczność nie tylko hamowanie czynności jajników, ale także wykluczenie czynności przysadki, to znaczy obniżenie czynności źródeł ciał gonadotropowych.

Bliższe poznanie udziału czynnika wewnątrzpochodnego powinno rzucić światło na zagadnienie w jakim stopniu ustrój może wytwarzać bodźce nowotworotwórcze. Trudno przewidzieć jakim osiągnięciem praktycznym będą wyniki tych badań, niewątpliwie jednak prowadzą one do poznania czynnika nowotworotwórczego ustroju i posiadają duże znaczenie teoretyczne, a jednocześnie mogą być drogowskazem do dalszych badań w tej dziedzinie. Dlatego też poznanie tych zagadnień, a nawet ich pojedyńczych ogniw posiada duże znaczenie.

Wśród narządów wewnętrznego wydzielania najmniej dotychczas zwracało na siebie uwagę łożysko. Czynność jego trwa krótko, obejmuje bowiem okres ciąży, podczas której właściwości biochemiczne i czynności wewnątrzwydzielnicze łożyska są bardzo złożone. W okresie ciąży zachodzi również ścisła zależność i współczynność gruczołów wewnętrznego wydzielania z łożyskiem, które wytwarza kompleks hormonów. W drugim i trzecim miesiącu ciąży łożysko produkuje odpowiednią ilość hormonów jajnikowych (progesteron, estrogen — Ehrhardt), tak, że nawet obustronnę usunięcie jajników w tym okresie nie przerywa ciąży i przebiega ona normalnie (Waldstein, Nelson, Arvay i inni). Hormony zatem wydzielane przez łożysko zdają się być identyczne z hormonami jajnikowymi, co zresztą potwier-

dzają liczne badania doświadczalne, przy czym zwracają uwagę, że fizjologiczne właściwości łożyska są różne u różnych zwierząt.

. Właściwości wydzielnicze łożyska nie ograniczają się tylko do wytwarzania gonadotropin, estrogenów i progesteronu, ale także produkują z niesterolowych relaksynę. Badania nad wzmożoną przemianą stereoidów w okresie ciąży wskazują, że łożysko pod względem aktywności wydzielniczej nie ustępuje korze nadnerczy. Aktywność łożyska jest tak wyraźna, że nawet otrzymało ono nazwę „narządu korowo-nadnerczowej adaptacji". Dodać należy, że gonadotropiny łożyska są produkowane przez komórki kosmówki. Pojawiają się one w ustroju kobiecym z chwilą, gdy zaczyna się rozwój kosmówki, znikają z moczu z chwilą, gdy łożysko po porodzie opuszcza ustrój kobiety. Gonadotropiny zjawiają się we krwi i moczu w okresie ciąży w drugim tygodniu po owulacji, co pozwala na wczesne rozpoznanie ciąży (Aschheim, Zondek, Friedman).

Ilość hormonów gonadotropowych ulega stałemu postępującemu zwiększaniu i osiąga największe nasilenie w okresie przedporodowym, znika natomiast dość gwałtownie po porodzie (Evans, Zondek i inni). Jak wykazały badania Aschheima, Zondeka, Arona i innych głównym narządem produkującym te olbrzymie ilości gonadotropin, jakie widzi się w czasie ciąży, jest łożysko, mimo iż nie można wykluczyć udziału przysadki mózgowej. Olbrzymia aktywność łożyska w kierunku wytwarzania hormonów gonadotropowych znalazła potwierdzenie w całym szeregu faktów, które wskazują, że po niekompletnym poronieniu wytwarzanie hormonów nie ustaje, a guzy tkanek zarodkowych *(chorionepithelioma)* utrzymują wysoki poziom gonadotropiny we krwi. Inne obserwacje stwierdzają, że rozrodcze i przerzutowe czynności procesów nowotworowych wyrażają się skalą wydzielniczą hormonów. Zniszczenie tkanki nowotworowej przez zabieg operacyjny lub działaniem radu powoduje zniknięcie hormonów z moczu i krwi. Także dowodem czynności wydzielniczej łożyska jest fakt, że części łożyska i tkanek kosmówki (z ciąży pozamacicznej) rosną na pożywkach i wydzielają hormony przez okres od 2 do 7 miesięcy. Przytoczone fakty wskazują więc, że łożysko posiada zastępczą zdolność wydzielania estrogenu i progesteronu, a równocześnie wzmacnia czynności jajników. Biorąc więc pod uwagę wspólnotę cech biochemicznych i czyn-

nościowych jednych i drugich hormonów gonadotropowych, można przypuszczać istnienie pewnego wpływu hormonów łożyska na przebieg procesów nowotworowych. Opierając się na tych przypuszczeniach podjęliśmy próbę badań doświadczalnych nad działaniem wyciągów z tkanek łożyska na przeszczepialność i rozwój nowotworu u myszy.

Materiał i metodyka badań

Wyciągi z tkanek łożyska myszy wstrzykiwano myszom przed zaszczepieniem nowotworu. Metoda sporządzania wyciągu z tkanek łożyska stosowana w naszych doświadczeniach, różniła się od zwykle używanych metod otrzymywania wyciągów z tkanek i narządów, które posługują się płynami o silnych własnościach ekstrakcyjnych, a mianowicie: chloroformem, benzenem, produktami naftowymi, eterowymi i innymi. Przy sporządzaniu wyciągu z łożyska myszy zdecydowaliśmy nie używać płynów drażniących pośrednio lub bezpośrednio, a zastosować jedynie sposób metody Fiłatowa.

Ciężarne myszy, w wieku 90 — 110 dni, w drugiej połowie ciąży, dekapitowano, płody usuwano i z jałowo wypreparowanych łożysk sporządzano wyciąg. Sposób przygotowania wyciągu był następujący: tkankę łożyska (30 g) przechowywano przez tydzień w temperaturze 2—4°C, poczym przecierano i rozcieńczano 10-krotną ilością wody destylowanej. Zawiesinę pozostawiano przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej, następnie ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze +70°C przez jedną godzinę, a po przesączeniu przez bibułę filtracyjną ogrzewano w dalszym ciągu na łaźni wodnej w temperaturze +70°C przez jedną godzinę. Tę ostatnią czynność powtarzano przez trzy kolejne dni.

Wyciąg z łożyska stosowano w postaci podskórnych zastrzyków. I serii 30 myszy wstrzykiwano wyciąg z łożyska w ilości 0,04 ml, co trzeci dzień. Ogólnie wykonano 15 zastrzyków. Na 10 dzień po ostatnim zastrzyku transplantowano podskórnie w okolicę grzbietową roztartą tkankę nowotworu mięsaka Crockera. II serii myszy kontrolnych transplantowano ten sam nowotwór w tej samej postaci, bez uprzednich wstrzykiwań wyciągu łożyska.

Do doświadczeń były używane w tej samej ilości samce i samice białych myszek, własnej hodowli, nisko rakowe (mniej

niż 0,5% samoistnych nowotworów). Materiał do przeszczepień nowotworu był pobrany od 4 myszy z nowotworowymi guzami mięsaka Crockera. Materiał był przygotowany jednakowo dla obu grup i przeszczepiany jednocześnie i w jednakowych ilościach.

W okresie wstrzykiwań wyciągów łożyska myszy zachowywały się normalnie, przyjmowały pokarm chętnie i stan ten trwał do chwili wytworzenia się u nich guzów nowotworowych znacznej wielkości.

Omówienie wyników badań i wnioski

Po trzech dobach od chwili przeszczepienia nowotworu obu grupom myszy doświadczalnych, w grupie „łożyskowej" nowotwór wielkości ziarna grochu wytworzył się u 25 myszy, podczas gdy w grupie kontrolnej w tym samym dniu stwierdzono guzki nowotworowe zaledwie wyczuwalne tylko u 4 myszek.

Po 10 dobach (tablica, dzień 21.IV) nowotwór w grupie „łożyskowej" powiększa się z dnia na dzień, dochodząc do wielkości dużego bobu. W tym okresie w grupie kontrolnej nowotwór powstaje jeszcze u 10-ciu myszy, jednak wielkość guzów u tych myszy jest znacznie mniejsza (tabl. dz. 2.V).

W dalszym przebiegu doświadczenia guzy w grupie „łożyskowej" rosną bardzo szybko, a na 11 i 15 dzień po przeszczepieniu dochodzą do wielkości orzecha włoskiego (tabl. dz. 23—26.IV.), w grupie kontrolnej natomiast w tym okresie widoczne są guzki ledwo wyczuwalne u 10 myszy, a wkrótce jeszcze u 6-ciu, co łącznie stanowi 20 myszy kontrolnych z guzkami nowotworowymi wielkości ziarna grochu (tabl. dz. 2.V.). W 15 dniu po przeszczepieniu w grupie myszy „łożyskowych" jedna pada z guzem wielkości jaja kury i drugim mniejszym, a po dalszych 7 dniach z tejże grupy padają następne 3 myszki (tabl. dz. 2.V. i 5.V.). W tym okresie guzy grupy kontrolnej rosną bardzo powoli i dopiero na 30 dzień po przeszczepieniu dochodzą do wielkości wiśni i bobu.

U myszy „łożyskowych" guzy nowotworowe rosną w dalszym ciągu szybko i dochodzą do wielkości średniego i dużego jaja kurzego zajmując niemal całą grzbietową powierzchnię zwierzęcia. Około 20 dnia od zaszczepienia myszy grupy „łożyskowej" zaczynają padać. Guzy są duże i twarde, nie stwierdzono w nich rozmiękania i ropienia. U 4 myszy tej grupy zauważono przerzuty

do jamy brzusznej, a u kilku innych w miejscu przeszczepu zjawiło się na grzbiecie kilka mniejszych guzków.

W grupie kontrolnej na 30—38 dzień padło 2 myszki (tabl. dz. 20. 24 i 26.V., 3.VI.). Guzy tych myszek były znacznie mniejsze w porównaniu z guzami grupy „łożyskowej", przy czym były one w stanie rozpadu i ropienia, a to pozwalało przypuszczać, że bezpośrednią przyczyną śmierci mogło być ogólne zakażenie.

W drugiej połowie doświadczalnego okresu guzy myszek „łożyskowych" były duże, tkanka nowotworowa twarda i zbita. Mimo dużych rozmiarów w żadnym przypadku nie obserwowano rozmiękania. Myszy padały w stanie wielkiego wyniszczenia, lub w takim stanie były dekapitowane. Okres życia myszy „łożyskowych" był bardzo różny, część ich padła w pierwszej połowie okresu doświadczalnego, inne przeżyły około 80 dni od przeszczepienia nowotworu.

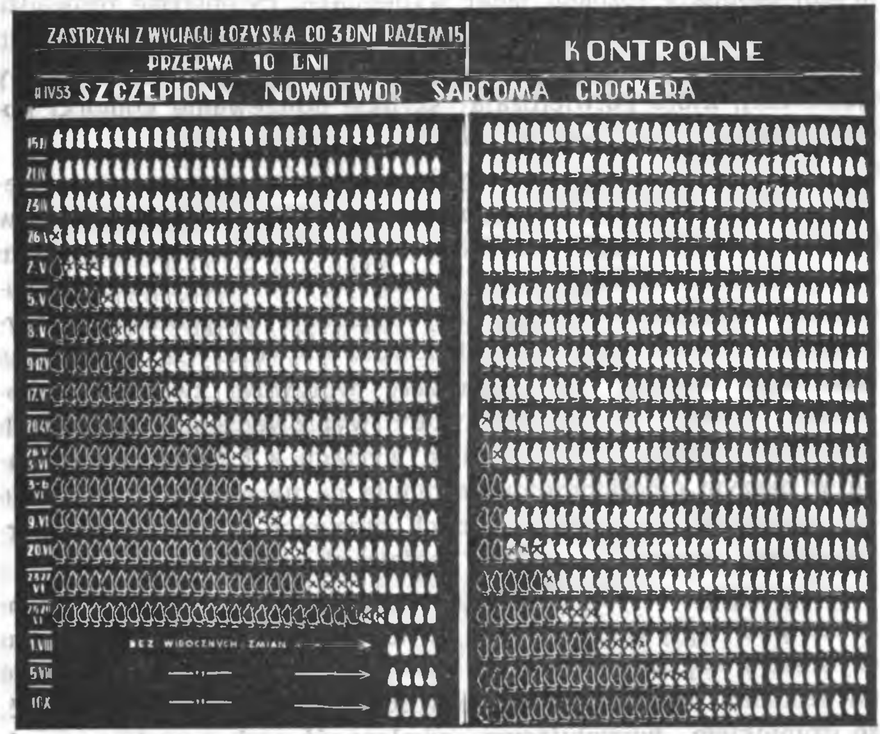
W dalszym przebiegu doświadczenia odróżniającą cechą grupy kontrolnej był powolny rozrost nowotworu i znacznie mniejszy rozmiar guzów w zestawieniu z guzami grupy pierwszej, które niejednokrotnie zajmowały, jak wspominaliśmy, całą powierzchnię grzbietową i były większe od zwierzęcia. Wszystkie guzy grupy kontrolnej cechował wczesny rozpad tkanki nowotworowej i ropienie. Okres życia myszy grupy kontrolnej był dłuższy. Najwięcej myszek padło pomiędzy 100—120 dniem, a ostatnie dekapitowano w 180 dniu od przeszczepienia nowotworu.

W przeprowadzonych doświadczeniach zwraca uwagę wyraźna różnica sił przeszczepialności nowotworów w obu grupach: na 30 myszy w grupie „łożyskowej" nowotwór przyjął się u 25, w grupie kontrolnej na tę samą ilość nowotwór powstał z dużym opóźnieniem u 20. Należy wątpić czy tę różnicę przy tych samych warunkach doświadczalnych i tym samym materiale przeszczepianym można zaliczyć tylko do wyników przypadkowych. W grupie kontrolnej w żadnym przypadku nie stwierdzono przerzutów nowotworowych i zmian w jamie brzusznej w postaci płynu krwistego.

Obserwacje nasze wyraźnie wskazują zatem na dodatni wpływ zastrzyków wyciągu łożyska na siłę przeszczepialności i rozwój mięsaka Crockera. W naszym doświadczeniu zwraca także uwagę szybkość wzrostu nowotworu w grupie „łożyskowej". Po dwóch tygodniach u 25 myszy tej grupy nowotwór dochodził do wielko-

ści orzecha włoskiego, podczas gdy w grupie kontrolnej tylko 4 myszy mają guzy wielkości wiśni. W dalszym przebiegu doświadczenia różnice rozmiarów guzów nowotworowych zaznaczają się jeszcze bardziej, poza tym myszy „łożyskowe" z bardzo dużymi guzami zaczynają padać już w 15 dniu doswiadczenia. Wreszcie zwraca uwagę różnica okresu życia myszy doświadczalnych: w grupie „łożyskowej" myszy padają począwszy od 15 do 80 dnia z objawami wielkiego wyniszczenia, podczas gdy w grupie kontrolnej okres padania zaczyna się od 30 dnia i trwa do 113.

Tablica



Na podstawie uzyskanych wyników w naszych doświadczeniach można sądzić, że tkanka nowotworowa u myszy „łożyskowych" znalazła bardzo sprzyjające warunki rozwoju. Zaznacza się to tym wyraźniej, że rozrost mięsaka Crockera na podłożu dowolnie wybranej myszy ma przebieg powolny i ulega rozpadowi, natomiast ustrój myszy po zastrzykach wyciągu łożyska stwarza

podłoże ułatwiające powstawanie i szybki rozrost tkanki nowotworowej nie mającej skłonności do rozpadu. Badania nasze nie wykazują dostrzegalnych różnic pomiędzy samcami i samicami, na podstawie tego można sądzić, że wyciąg łożyska wpływa jednakowo na obie płcie.

Badania mikroskopowe nie wykazały wyraźnych różnic histologicznych w budowie nowotworów obu grup doświadczalnych. Obrazy szeregu preparatów pozwalają jednak wnioskować, że u myszy „łożyskowych" tkanka nowotworowa charakteryzuje się większym stopniem rozpadu, przede wszystkim jąder komórkowych; produkty rozpadu jąder wypełniając cytoplazmę prowadzą do jej rozpadu. W obrazie histologicznym nie widzi się typowych figur podziału jądra, w przeciwieństwie do preparatów z grupy kontrolnej, które potwierdzają szybkie dojrzewanie komórki nowotworowej prowadzące do rozrostu i rozpadu guza.

Zastosowany przez nas wyciąg z łożyska przygotowany według metody Fiłatowa daje zupełną pewność uniknięcia wpływów substancji ubocznych wprowadzonych do ustroju myszy razem z wyciągiem. Metoda nasza różni się od dotychczas stosowanych w technice onkologicznej sposobów przygotowania wyciągów z tkanek lub substancji nowotworotwórczych. Dotychczas stosowane metody nie wykluczały wpływów związków ubocznych, a przez to uniemożliwiały wyprowadzenie dokładnych wniosków. Metoda przygotowania wyciągu z łożyska zastosowana w naszym doświadczeniu zasługuje na uwagę, gdyż wskazuje na możliwość otrzymania czynnych substancji, o charakterze hormonalnym, w postaci zupełnie obojętnych związków.

Występujące różnice siły przeszczepialności i rozrostu nowotworu pod wpływem wyciągu z łożyska świadczą o istnieniu czynników wyzwalających u zwierzęcia wzmożoną wrażliwość na działanie bodźca nowotworotwórczego. Należy przypuszczać, że czynnikiem wywołującym odmienność cech nowotworowych są wprowadzone przy szczepieniu wyciągiem z łożyska, hormony, które wytworzyły specjalną ekspozycję ustrojową na zadziałanie bodźca zewnętrznego.

Prawdopodobnie substancje nowotworotwórcze są stale wytwarzane w ustroju i stanowią jego fizjologiczne składniki, które na normalne tkanki nie mają ujemnego wpływu. O ile jednak substancje te są wytwarzane w nadmiernej ilości, lub zostaną

wprowadzone do ustroju w nadmiernej ilości ustrój staje się wrażliwy na wszelkie bodźce nowotworotwórcze.

Tę nabytą wrażliwość prawdopodobnie wywołaliśmy w naszych doświadczeniach wprowadzając wyciąg z łożyska obfitujący w czynne hormony. Powstać więc może pytanie: czy nasze obserwacje nad działaniem wyciągu z łożyska na nowotwór mogą łączyć się z procesami biochemicznymi zachodzącymi u człowieka w chorobie nowotworowej.

Ustrój wytwarza w swych tkankach substancje nowotworotwórcze w postaci cholesterolu oraz pokrewnych związków, jak np. kwasu cholowego, follikuliny, testosteronu. Związki te są prawdopodobnie częściowo wydzielane z ustroju, częściowo ulegają rozłożeniu na związki prostsze, po przejściu przez szereg związków pośrednich. Można przypuszczać, że jeśli wytwarza się nadmiar tych związków w ustroju, fizjologiczna ich koncentracja może stać się wystarczającą do wywołania nowotworowego przeobrażenia komórek wrażliwych na ich działanie.

Znany jest szereg bodźców wyzwalających nowotwory, brak jednak znajomości przebiegu biochemicznych procesów prowadzących do występowania nadmiernej ilości substancji nowotworotwórczych wywołujących nadwrażliwość tkanek na schorzenia nowotworowe.

Poznanie tych procesów ma zasadnicze znaczenie. Wyniki naszego doświadczenia rzucają światło na to zagadnienie.

Czy substancje hormonalne wytwarzające się okresowo w ustroju kobiety są całkowicie wydzielane, czy zostają one przekształcone w inne pochodne związki, w jakiej ilości mogą one pozostawać w ustroju, czy mogą być kumulowane, czy wreszcie mogą one mieć wpływ na stany predyspozycyjne w przekształcaniu się tkanek w nowotwory, są to zagadnienia dla badań przyszłych.

PIŚMIENNICTWO

1. Endocrinology of neoplastic diseases. Symposium by eitheen authors. 1947.
2. Friedman M. H., Lapham M. E.: Am. J. Obstr. a. Gynec. Vol. 21, 3405. 1931.
3. Groilman A.: Essentials of Endocrinology.
4. Iwanow I. I., Mardaszow, C. P., Zabrski B. I.: Biołogiczeskaja chimia. Moskwa. 1951.
5. Recent progress in hormon research. Vol. I. 1947. Vol. VI. 1951.
6. Zondek B., Aschheim S.: Klin. Wochenschft. 6. 248. 1927.

РЕЗЮМЕ

Автор исследовал влияние вытяжки плаценты белых мышей, приготовленной методом Филатова на прививку и развитие саркомы Crocker'a. Исследования автора показывают, что вытяжка плаценты увеличивает прививку и развитие новообразования у мышей и придает опухоли несколько иной характер.

Исследования автора имеют также и это значение, что он первый приметил приготовление тканевой вытяжки методом Филатова как активного субстракта.

SUMMARY

The author's investigations concern the influence of placentar extract prepared by the method of Filatow on the transinoculation and developement of Crocker's tumor (Crocker's sarcoma) in the mouse.

These researches showed an increase of the transinoculative strength and of the growth of this type of tumor in comparison with the control group.

The author's results of investigations should be taken under consideration because of the fact of applying cancerogenes preparations for the first time by Filatow's method.

Papier bezdrz. III kl. 80 g. Format 70x100 Ark. druku 10 str.
Annales U. M C. S. Lublin 1954 Lub. Druk. Pras.—Lublin, Buczka 12. Zam. Nr 2352 27.VIII.54 r.
825 egz. A-5-27267 Data otrzymania manuskryptu 27.VIII.54. Data ukończenia druku 10 XI 54 r.